

ACADÉMIE de PARIS

UNIVERSITÉ PARIS V

FACULTÉ de MÉDECINE COCHIN PORT-ROYAL

Année 1970
—

THÈSE

N°

10

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

MARTINE DEVILLERS
—

Née le 5 NOVEMBRE 1944 à PARIS 12ème

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLICQUEMENT LE

A PROPOS DE L'IMMUNOFLUORESCENCE APPLIQUÉE

AU DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE DE LA TOXOPLASMOSE

PRÉSIDENT

M. J. LAPIERRE

PROFESSEUR

ACADÉMIE de PARIS

UNIVERSITÉ PARIS V

FACULTE de MEDECINE COCHIN PORT-ROYAL

Année 1970

N°

THESE

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

MARTINE DEVILLERS

Née le 5 NOVEMBRE 1944 à PARIS 12ème

PRESENTÉE ET SOUTENUE PUBLICQUEMENT LE

A PROPOS DE L'IMMUNOFLUORESCENCE APPLIQUÉE

AU DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DE LA TOXOPLASMOSE

PRÉSIDENT

M. J. LAPIERRE

PROFESSEUR



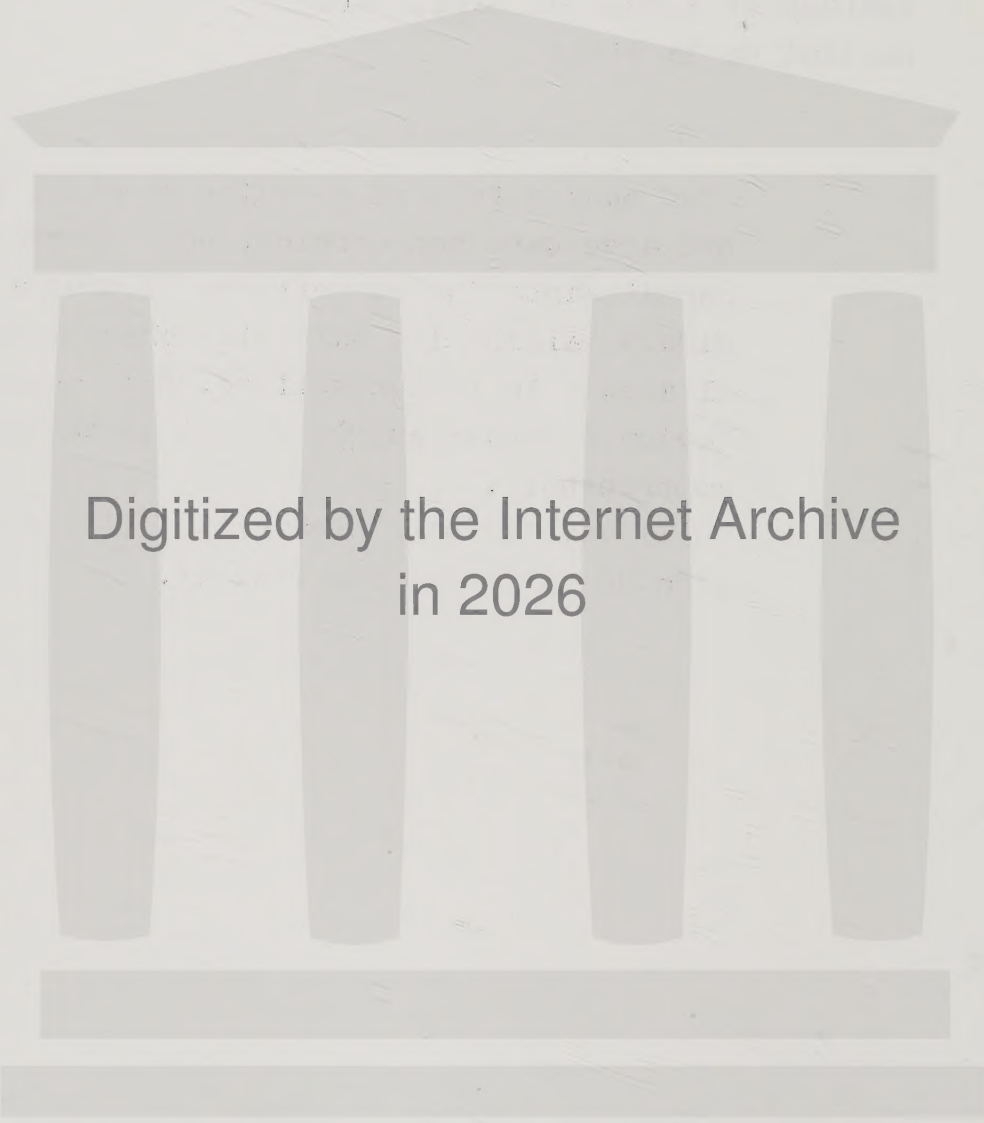
A Monsieur le Professeur J. LAPIERRE
Professeur Agrégé de parasitologie
Hopital Cochin

Que nous remercions respectueusement du
grand honneur qu'il nous a fait en accep-
tant la présidence de cette thèse.

A Monsieur le Professeur M. GENTILINI
Professeur agrégé de parasitologie
Hopital de la Pitié

Qui nous a inspiré le sujet de cette thèse,
préparée dans son service, nous sommes re-
connaissante des conseils qu'il nous a pro-
digués malgré les multiples charges dont
il assume la responsabilité. Nous avons
toujours trouvé auprès de lui un accueil
compréhensif.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expres-
sion de notre profond respect.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550207_0014

A Monsieur le Docteur G. NIEL

Nous exprimons toute notre gratitude pour la patiente bienveillance avec laquelle, malgré ses multiples tâches, il nous a constamment guidé dans ce travail.

Il nous a largement ouvert son laboratoire et nous lui en sommes infiniment reconnaissante.

INTRODUCTION

La toxoplasmose est une parasitose cosmopolite, commune à l'homme et à de nombreux animaux. Elle est due à un protozoaire: TOXOPLASMA GONDII, existant sous deux formes: végétative en croissant et kystique.

On distingue deux grandes formes cliniques de la maladie:

= congénitale, où la contamination du fœtus se fait par voie transplacentaire, lors d'une infection aiguë de la mère.

= acquise: le mode de contamination habituel est digestif, par absorption de viande (mouton surtout, mais aussi boeuf) insuffisamment cuite. Il existerait d'autres modes de contamination, mais ce problème n'est pas encore entièrement élucidé.

La toxoplasmose est une maladie extrêmement répandue dans l'espèce humaine: en France, par exemple, 80% des adultes de 30 ans ont une sérologie positive. Ce pourcentage, variable selon les pays, est probablement en rapport avec les habitudes alimentaires.

Cliniquement

Dans sa forme acquise, la maladie passe le plus souvent inaperçue, tant ses manifestations sont banales et bénignes. L'examen systématique, cependant, permet de mettre en évidence dans la moitié des cas, des adénopathies. On peut également noter un syndrome infectieux discret avec cependant, une asthénie marquée. Par ailleurs, la numération-formule sanguine, si elle était faite, montrerait une neutropénie relative avec mononucléose faite de cellules à cytoplasme hyperbasophile et une éosinophilie modérée.

La plupart du temps, tous ces symptômes disparaissent rapidement. Le plus souvent, ce n'est que l'examen sérologique

qui permet de faire un diagnostic rétrospectif.

Il existe cependant des formes graves (forme généralisée ou encéphalitique) mais elles sont très rares.

On peut aussi retrouver des syndromes très polymorphes.

La toxoplasmose oculaire, à mettre à part puisqu'elle peut s'observer dans la forme acquise aussi bien que dans la forme congénitale et à tous les stades de la maladie.

Elle est responsable de 25 à 50% des choriorétinites et uvéites postérieures. Elle est caractéristique en ce que l'agression des constituants de l'oeil par le toxoplasme détermine une production d'immunoglobulines qui peuvent être suffisantes pour augmenter significativement le taux d'anticorps de l'humeur aqueuse.

Par contre, la découverte d'un titre d'anticorps bas dans le sérum n'est pas exceptionnel , même lors des poussées évolutives . En effet, les lésions de toxoplasmose oculaire sont habituellement découvertes au stade chronique de la maladie, où la sérologie est stable à un niveau bas et n'augmente pas lors des reprises évolutives de toxoplasmose oculaire. Si bien que la sérologie classique est le plus souvent impuissante à affirmer l'étiologie toxoplasmique d'une lésion oculaire.

Par contre, la comparaison du titre de l'humeur aqueuse et du sérum permet de déterminer un coefficient représentant l'activité anticorps de l'humeur aqueuse dont les variations permettent d'affirmer ou de rejeter l'origine toxoplasmique de lésions observées.

La toxoplasmose congénitale, maladie grave mais heureusement rare, se manifeste différemment selon le stade de la grossesse auquel la maladie a été contractée par la mère et transmise au fœtus.

Une contamination précoce peut être responsable d'un avortement, d'une mort in utero, d'un accouchement prématuré ou de lésions neurologiques évolutives ou séquellaires très polymorphes. Les lésions les plus habituellement rencontrées sont l'hydrocéphalie, rarement la microcéphalie, les crises convulsives, les calcifications intra-cérébrales.

Les lésions oculaires sont fréquentes, comme d'ailleurs à tous les stades.

Une infection de la mère au cours du deuxième trimestre de la grossesse peut déterminer chez l'enfant une encéphalomyélite.

En cas de contamination pendant le dernier trimestre de la grossesse, le fœtus peut présenter à la naissance, un ictère grave semblable à celui de l'iso-immunisation rhésus..

Cependant, quel que soit le stade de la grossesse auquel a été contractée la maladie, l'enfant peut naître apparemment indemne et le rester, ou présenter plusieurs mois plus tard seulement des lésions de toxoplasmose.

Il est donc important de faire le diagnostic, et ceci, par l'examen sérologique répété de la mère et de l'enfant, afin d'instituer un traitement efficace avant l'apparition de lésions irréversibles.

En dehors de la clinique qui, nous l'avons vu, est le plus souvent pauvre et non spécifique, le diagnostic de la toxoplasmose repose sur les examens sérologiques:

I° diagnostic direct par isolement du parasite dans les produits pathologiques:

- très rarement, l'examen microscopique permet un tel diagnostic

- l'inoculation à la souris qui développe une ascite riche en to o-
plasmes

2° diagnostic sérologique qui met en évidence la réaction de l'hôte.

- Dye-test ou test de lyse
- fixation du complément
- hémagglutination
- immunofluorescence

Dans ce travail, nous n'étudierons qu'une des techniques biologiques de diagnostic de la toxoplasmose: l'immuno luores-
cence:

diagnostic direct: IF directe

diagnostic indirect: IF indirecte

inhibition de l'IF

PRINCIPE DE LA METHODE

La pénétration d'un antigène dans un organisme étranger provoque la formation d'anticorps capables de réagir électivement et spécifiquement avec lui. C'est la mise en évidence de ce complexe antigène-anticorps qui constitue le but de toute réaction sérologique.

L'utilisation d'anticorps spécifiques conjugués à un conjugué fluorescent permet de reconnaître en microscopie ultra-violette, leur fixation spécifique sur les antigènes figurés correspondants.

MARRACK (1939) a montré en effet, que la conjugaison d'anticorps avec certains colorants ne modifie pas les propriétés immunologiques de ceux-là.

L'anticorps marqué appelé conjugué, est mis en contact avec l'antigène envisagé; après un temps de contact suffisant la préparation est lavée pour éliminer les anticorps fluorescents non fixés, et examinée en lumière ultra-violette.

I° Méthode directe

Elle ne fait pas partie, à proprement parler, du diagnostic sérologique de la toxoplasmose.

Cette technique vise à démontrer la présence de toxoplasmes dans une coupe de tissus en utilisant l'anticorps marqué correspondant.

I° Réaction positive



2° Réaction négative

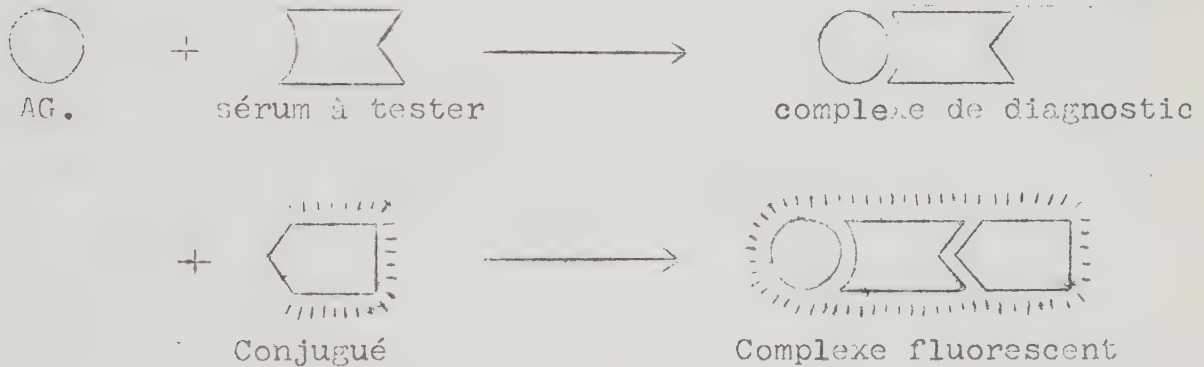


2° Méthode indirecte

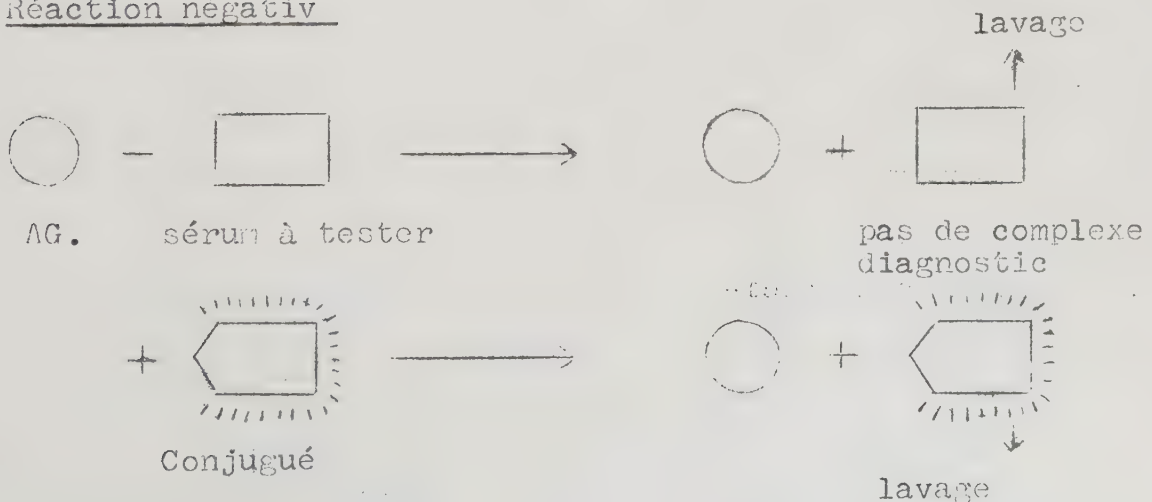
Elle permet la mise en évidence d'anticorps spécifiques dans un sérum.

Dans cette réaction, le conjugué fluorescent est un sérum de lapin antiglobulines humaines qui permet de révéler le complexe antigène-anticorps. En effet, vis à vis d'un anti-sérum humain, les anticorps toxoplasmiques, globulines, se comportent comme des antigènes et réagissent avec lui pour former un complexe antigène-anticorps.

I° Réaction positive



2° Réaction négative



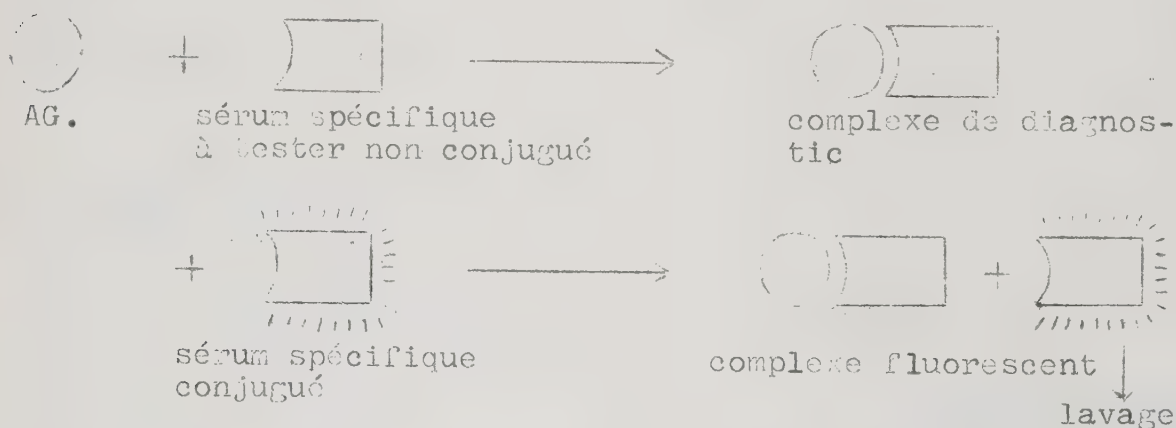
3° Méthode d'inhibition

Le principe est tout à fait différent de celui de la réaction précédente; le conjugué fluorescent est un sérum humain ou animal contenant des anticorps toroplasmiques à un taux élevé en test de lyse.

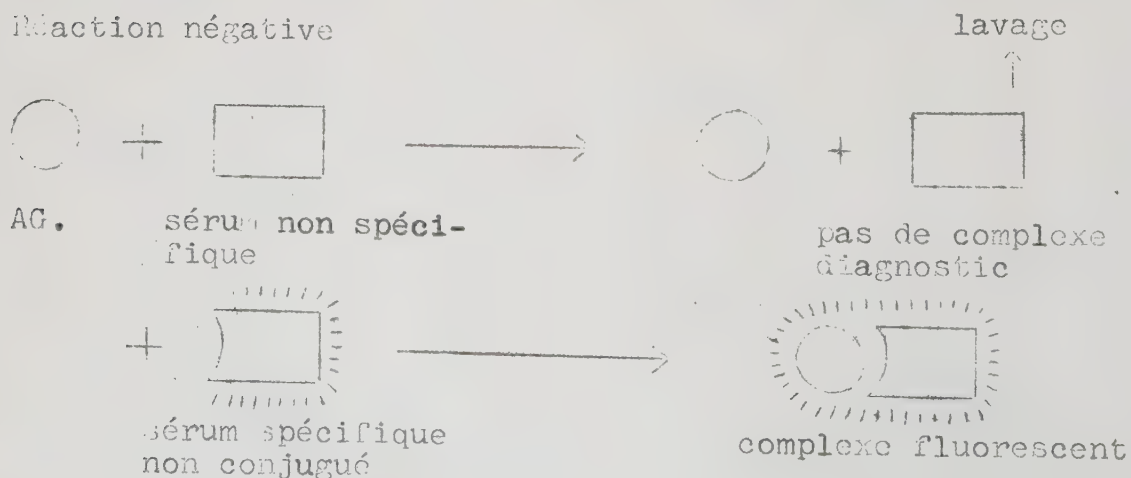
Ce sérum est mis en présence de l'antigène et du sérum à tester. Si le sérum contient des anticorps toroplasmiques, les anticorps fluorescents ne pourront plus se fixer sur les sites antigéniques et seront éliminés lors du lavage; la lame restera uniformément sombre.

En cas de sérum négatif, on observe une fluorescence verte en lumière ultra-violette.

1° Réaction positive



2° Réaction négative



TECHNIQUE ET RESULTATS

I° Methode directe

Cette technique a été mise au point par GOLDMAN aux U.S.A. puis reprise par AMBROISE THOMAS en France.

Le conjugué utilisé est préparé à partir d'un sérum humain (de cobaye pour Ambroise Thomas) de titre élevé au Dye-test (1/4000). Les globulines contenant les anticorps antitoxoplasmiques sont séparées par le sulfate d'ammonium puis marquées, in vitro, par l'isothiocyanate de fluorescéin par inoculation avec le colorant fluorescent.

Certains auteurs font ensuite une adsorption par poudre de foie pour augmenter la spécificité du conjugué.

L'antigène est préparé à partir de fragments de foie, reins, rate et poulons prélevés sur des souris infectées 3 ou 4 jours auparavant par une souche très virulente de toxoplasme, ou à partir de frottis d'exsudat péritonéal de souris infectées.

les fragments d'organe sont fixés chimiquement (solution de WOLMAN et FEHAR) ou par congélation, puis inclus dans la paraffine et coupés au microtome de façon à avoir des coupes de 4 μ d'épaisseur.

Avant la coloration, les coupes sont déparaffinées par passage dans le xylol et l'alcool et réhydratées.

Les lames de préparation antigénique sont recouvertes de 2 à 3 gouttes de conjugué et laissées une heure à l'incubation à 37°. Après quoi, elles sont lavées dans du sérum physiologique à PH 7,2.

La préparation, séchée, montée dans une goutte de glycérine tamponnée à PH alcalin est examinée en lumière ultraviolette.

Récemment (1968) ,GARIN et ANDROISE THOMAS ont essayé d'utiliser comme marqueur la déméthylchlortétracycline (DMTC) tétracycline active sur le toxoplasme, donc qui devrait se fixer sur lui, et en même temps fluorochrome. En fait, si l'expérience s'est révélée intéressante in vitro, in vivo ces auteurs n'ont pas observé de marquage des toxoplasmes.

RESULTATS

Cette technique n'a permis le repérage des toxoplasmes que sur des préparations où la coloration panoptique et l'examen en lumière ordinaire l'avait obtenu.

Cependant, bien qu'elle ne modifie pas la nature des résultats, l'immunofluorescence apporte une amélioration dans le diagnostic direct de la toxoplasmose: seuls les parasites présentent une fluorescence vive facilement reconnaissable.

La coloration, surtout nette au niveau des bords et des extrémités effilées, dessine la forme en croissant du parasite et facilite l'identification des sections de toxoplasmes, difficilement reconnaissables autrement.

GOLDMAN a étudié

a) la spécificité de la réaction:

1° lames de toxoplasmes mises en contact avec du sérum humain négatif en DT: on n'observe pas de fluorescence.

2° absence de fluorescence si la lame est, dans un premier temps, mise en contact avec un sérum anti-toxoplasmique non marqué puis avec un sérum marqué.

3° Par contre on observe une fluorescence des toxoplasmes si la lame est d'abord mise en contact avec un sérum normal non marqué puis avec un antisérum marqué.

4° Une dernière expérience consiste à mettre en contact d'une lame de Trypanosoma Cruzi un sérum normal marqué et un sérum antitoxoplasmique marqué: dans ce cas on observe une fluorescence faible très différente de celle observée avec les toxoplasmes.

b) Capacité de coloration des toxoplasmes après différents traitements:

L'acétone, le méthanol ou le formol ne modifie pas les capacités de coloration par les fluorochromes si le temps de contact est court. Par contre, un contact prolongé des toxoplasmes avec du formol diminue la fluorescence de ceux-ci dans des expériences ultérieures.

De même, le chauffage ou l'abandon prolongé des lames à la température ambiante diminuent la capacité de coloration des toxoplasmes.

Tous ces éléments sont intéressants à connaître pour ne pas commettre d'erreurs dans la préparation ou la fixation des lames ce qui modifierait les résultats obtenus en immunofluorescence;

Cependant, la mise en évidence du parasite dans un produit pathologique est un travail long et difficile et ne saurait que constituer un élément de certitude dans le diagnostic de la toxoplasmose.

Dans tous les cas, le diagnostic biologique de la toxoplasmose revient aux réactions sérologiques. En ce qui concerne l'immunofluorescence, deux méthodes peuvent être utilisées pour mettre en évidence les anticorps toxoplasmiques dans un sérum:

- méthode indirecte
- méthode d'inhibition

2° Méthode indirecte

Plus récente que la méthode d'inhibition, elle présente sur celle-là l'avantage d'être facilement reproductible et d'utiliser un conjugué préparé une fois pour toutes.

L'antigène est préparé à partir d'une ascite de souris infectée 3 ou 4 jours auparavant par une souche rh de Sabin. l'ancienneté de l'infection est importante, car il semble que le potentiel antigénique de l'exsudat varie au cours du temps. Les ascites les plus riches en matériel antigénique sont celles qui contiennent le plus de toxoplasmes nouvellement extra-cellulaires.

La cavité abdominale de la souris est rincée au sérum physiologique qui est recueilli et ajouté au liquide d'ascite pur. Après incubation à 37° pendant 1/2 heure, l'ascite est centrifugée; le culot de centrifugation contenant les toxoplasmes est soumis à plusieurs lavages qui éliminent les impuretés qui seraient responsables de fluorescence parasite.

Les toxoplasmes sont ensuite remis en suspension dans une solution formolée de façon à avoir 2000 parasites par ml.

On peut procéder, à partir de cette suspension à une lyophylisation qui augmente beaucoup la durée de conservation de l'antigène. GARIN et AMBROISE THOMAS ont montré qu'il existe une concordance parfaite entre les résultats obtenus par antigène formolé ou lyophylisé.

L'utilisation plus récente d'antigène préparé sur culture cellulaire semble devoir améliorer notablement la technique car elle permet d'obtenir des réactifs stables et d'éliminer les difficultés éventuelles en rapport avec la production d'anticorps par les animaux servant à la préparation de l'antigène.

BETZ utilise des cultures de cellules de thyroïde humaine ou de reins de veau ensemencées avec des toxoplasmes.

Le passage indéfini de culture cellulaire à culture cellulaire est possible si l'on utilise des cultures cellulaires jeunes et des doses d'inoculation importantes, et si les toxoplasmes sont prélevés dès leur passage hors des cellules.

Les cultures sur souche Héla permettent d'adapter les toxoplasmes à des lignées cellulaires continues.

Le liquide de culture contient après 5 à 6 jours d'inoculation à 37° les toxoplasmes et des débris cellulaires qui sont éliminés par filtration et ultra-centrifugation.

La suspension, formolée, est prête à l'emploi. Dans ce cas la lyophilisation ne peut être employée car elle modifie trop la morphologie des toxoplasmes.

Cette méthode de préparation de l'antigène à partir de cultures cellulaires permet d'obtenir un matériel beaucoup plus pur et donc beaucoup moins susceptible de donner une fluorescence non spécifique.

Quelle que soit la méthode employée pour l'obtention de l'antigène, on réalise à partir de la suspension, des étalements secs sur lames siliconnées qui peuvent être conservés plusieurs mois au congélateur à 37°C.

Ainsi il est possible d'avoir toujours à sa disposition des préparations antigéniques.

Par ailleurs, chaque lame peut être utilisée pour plusieurs tests; sur les lames sont gravés quatre cercles de 5 mm. de diamètre qui reçoivent chacun une goutte de suspension antigénique.

Les sérum à étudier sont utilisés dilués dans du sérum physiologique tamponné à pH 7,2.

Le conjugué est un sérum de lapin ou de chèvre antigamma-

globulines humaines. L'animal reçoit plusieurs injections de sérum total ou de gamma-globulines d'origine humaine.

Le sérum est recueilli une semaine après la dernière injection et conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine.

Ce sérum doit évidemment être exempt d'anticorps toxoplasmiques.

Exécution de la réaction: on dispose une goutte de sérum sur les étalements antigéniques préalablement séchés à l'air. Les lames sont placées à l'étuve en atmosphère humide à 37° pendant 1/2 heure. Elles sont ensuite lavées dans du sérum physiologique tamponné à pH 7,2 puis séchées.

On fait alors agir le conjugué dans les mêmes conditions que précédemment.

Les lames sont enfin lavées dans du sérum physiologique tamponné qui élimine le conjugué non fixé puis dans de l'eau bidistillée qui dissout les éventuels cristaux, formés sur la lame par la solution tampon.

Les lames sont égouttées et examinées en lumière ultraviolette, montées dans une goutte de glycérine.

Pour chaque série de lames, on fait parallèlement:

- un sérum témoin -
- un sérum témoin +
- un témoin antigène pour s'assurer que le conjugué ne contient pas d'anticorps.

Les résultats sont exprimés en + , de 2+ à 4+

Le problème majeur provient, comme pour toutes méthodes d'immunofluorescence, des fluorescences parasites; elles peuvent être d'origine antigénique ou être le fait de l'antisérum insuffisamment purifié.

Pour remédier à cela, on peut utiliser des filtres, mais il y a peu de filtres utilisables en pratique, ou purifier l'anti-sérum par dialyse, chromatographie ou adsorption sur poudres d'organe; ce sont des opérations longues qui, par conséquent, retirent de son intérêt à la réaction d'immunofluorescence.

on utilise donc actuellement la méthode de conjugué dilué mais cela nécessite d'avoir un antiserum de titre élevé; et surtout, les contre-colorants.

les contre-colorants sont des substances présentant une teinte rouge en lumière ultra-violette qui ne laisse passer que la fluorescence jaune-vert spécifique de l'antigène sensibilisé par l'anticorps marqué.

STADSTRAEDER a d'abord utilisé comme contre-colorant l'albumine de boeuf conjuguée à la rhodamine, mais le produit est peu actif et exige un temps de contact prolongé.

AMBROISE THOMAS et GARIN ont alors mis au point une contre-coloration par le bleu Evans qui n'exige que 10 minutes de temps de contact et donne des résultats très nets.

Dans une réaction + , les toxoplasmes sont colorés en jaune-vert à la périphérie et en rouge au centre; si la réaction est - le parasite est uniformément coloré en rouge.

Cette technique a beaucoup augmenté la sensibilité de la réaction car elle élimine l'élément subjectif de la lecture.

Par ailleurs, nous avons vu comment la fluorescence non spécifique d'origine antigénique pouvait être éliminée par l'emploi de cultures cellulaires.

RESULTATS

Par la méthode indirecte d'immunofluorescence on détecte la présence d'anticorps toxoplasmiques dans un sérum à étudier.

Les toxoplasmes sensibilisés par l'anticorps donnent une

fluorescence jaune-vert en lumière ultra violette.

On considère que la réaction est + quand 50% des toxoplasmes deviennent fluorescents.

a) spécificité de la réaction étudiée par adsorption de sérum sur des organismes hétérologues et par essai de réactions croisées avec des sérums ou des organismes hétérologues:

-1'adsorption de sérums toxoplasmiques par *ESCHERICHIA COLI* ne modifie pas le titre des anticorps toxoplasmiques en immunofluorescence.

-on n'obtient pas de réactions croisées
=la réaction d'immunofluorescence est spécifique

b) reproductibilité de la réaction: on l'étudie en comparant les résultats obtenus par titration d'un même sérum, plusieurs fois à quelques jours d'intervalle.

CAMARGO dans une étude portant sur 84 sérums titrés 2 fois par le même laboratoire obtient un taux identique aux deux examens dans 53,6% des cas. Ce pourcentage passe à 100% quand on considère le titre à 1 dilution près.

Sur 30 sérums étudiés 3 fois, le titre est identique aux trois examens dans 50% des cas; 100% des sérums ont un titre identique dans les limites d'une dilution. DE toutes façon, on retrouve le même titre à au moins deux examens sur trois.

nous pouvons donc en conclure qu'à l'intérieur d'un même laboratoire, la reproductibilité de la réaction indirecte d'immunofluorescence est bonne, puisque dans 100% des cas, les résultats ne varient que dans les limites d'une dilution de raison 2.

Par contre, si nous étudions maintenant la reproductibilité d'un laboratoire à un autre, les pourcentages de concordance sont bien moindres. Bien que nous ne puissions donner ici de chiffres précis, étant donné le petit nombre de sérums étudiés

parallèlement par plusieurs laboratoires, il est cependant clair que la variabilité est beaucoup plus importante. Les titres variant de 2, 3, voire 4 dilutions à plusieurs examens successifs.

Ces différences tiennent à la grande variabilité d'un laboratoire à l'autre, de tous les éléments entrant dans la réaction:

- l'antigène qui peut provenir d'une ascite, d'une coupe de cerveau ou d'une culture de tissus.
- le conjugué de qualité très variable selon son origine.
- l'appareillage optique
- la réalisation même de la réaction qui n'est pas strictement codifiée.

Ce problème semble pouvoir, à l'avenir, être résolu par l'adoption d'une nouvelle expression des positivités sous forme d'unités internationales. En effet, dès 1963, l'OMS se préoccupait de diffuser des sérums étalons destinés au test de SABIN et FELDMAN et, sur cette base, organisait une confrontation entre divers laboratoires. En 1967, KRAGG et WEISBENTZON proposaient de définir une unité correspondant à 0,001 ml ; des sérums étalons. Les témoins, titrés en unité, permettent de préciser la sensibilité du test en unités internationales par ml. propre à chaque laboratoire, et fonction de sa technique et de ses moyens.

Ce facteur de correction appliqué aux titres obtenus, élimine les causes de divergences et assure l'identité des résultats.

Il a été montré récemment que cette notation peut aussi s'appliquer au test d'immunofluorescence dont l'importance et la large diffusion la justifient tout particulièrement.

3° Méthode d'inhibition

COONS et KAPLAN ont démontré qu'il était possible de bloquer la coloration d'un antigène par un anticorps marqué homologue si celui-ci est mis en contact, dans un premier temps, avec un anticorps homologue non marqué.

Cette méthode d'inhibition de la fluorescence a été mise au point par GOLDMAN aux U.S.A.

L'antigène provient d'un frottis d'exsudat péritonéal de souris infectée 3 à 4 jours auparavant.

Le conjugué: C'est un sérum humain de titre connu (1/4000) marqué par l'isothiocyanate de fluorescéine.

0,02 ml de sérum sont mélangés à 0,02 ml de conjugué dilué au 1/3 ou 1/5 dans une solution saline de sérum-albumine de boeuf.

Le mélange est mis en contact des lames de toxoplasmes 1 heure à 37° puis la lame est lavée, montée dans une goutte de glycérol tampon et examinée en lumière ultra-violette.

Les résultats sont notés de 0 à + à 4+ selon l'intensité de la fluorescence en comparaison avec une lame-test.

Positivité signifie absence d'inhibition donc absence d'anticorps dans le sérum examiné.

La méthode séquentielle consistait à faire agir d'abord, le sérum non marqué pendant 1 à 2 heures, rincer, puis faire agir le sérum marqué pendant le même temps. Cette méthode s'est révélée très imprécise.

la méthode combinée, par contre, c'est à dire, l'action simultanée de l'antisérum marqué et du sérum non marqué, donne des résultats beaucoup plus sûrs.

Cependant, les résultats dépendent de la concentration relative des deux sérums ; si bien que pour chaque série de

sérums à tester, il faut déterminer la concentration adéquate en prenant comme référence un sérum positif et négatif témoin

RESULTATS

a) reproductibilité : étudiée par la double titration de chaque sérum, dans le même laboratoire.

-1° Etude d'un groupe de sérums pris au hasard: 50 sérums étudiés parallèlement en DT et deux fois en IF

1° série d'expérience	42% +
IF	12% douteux
	46% -
2° série IF	50% +
	14% douteux
	36% -

En étudiant ces sérums parallèlement en DT, on voit que la non reproductibilité porte surtout sur les sérums de titre inférieur à I/256 en DT.

-Pour 8 sérums de titre I/256 en DT, on trouve 8 + puis 7 + et 1 douteux en immunofluorescence.

-pour 12 sérums de titre I/64, par contre, on trouve 4 puis 5 + en inhibition, 5 puis 3 -, les autres douteux..

On voit donc, que la reproductibilité de la réaction n'est pas bonne, surtout pour les sérums de titre faible. Ceci semble être en rapport avec la faible quantité de sérum utilisée (0,02 ml); la moindre erreur de pipettage entraîne, pour les sérums limites, des erreurs dans la lecture.

D'autre part, la lecture elle-même, est assez subjective puisqu'il ne s'agit plus d'évaluer une fluorescence, mais l'inhibition de cette fluorescence qui peut être plus ou moins nette.

-2° Sujets suspects de toxoplasmosse congénitale avec DT + : 25 sérums titrés, chiens et enfants.

22 + dans les 2 séries de tests d'inhibition.

3 + dans une série, - dans l'autre.

-3° Sujets suspects de toxoplasmosse congénitale, mais avec DT - ou + : dans cette étude portant sur 25 sérums, on trouve une bonne reproductibilité des résultats dans 80% des cas.

Ainsi donc, chez les sujets présentant des signes cliniques de toxoplasmosse, la reproductibilité de la réaction est satisfaisante, probablement parce que ces sujets ont un taux d'anticorps élevé.

b) la spécificité : absence de réactions croisées entre le toxoplasme et le sérum d'animaux immunisés contre des antigènes variés: pasteurelles, salmonelles, shistosomes, streptocoques ..., alors même que l'animal avait un titre élevé en anticorps hétérologues.

c) explication du phénomène d'inhibition: on met en présence, sur une même lame, 2 groupes d'anticorps identiques les uns marqués, les autres non, ayant la même affinité pour l'antigène homologues. Il en résulte une compétition entre les anticorps marqués et les non marqués pour les sites antigéniques.

Ainsi donc, si le sérum à tester est négatif, il n'y aura pas de compétition et les anticorps marqués se fixeront électivement sur les sites antigéniques; par contre, si le sérum contient des anticorps, ceux-ci auront tendance à se fixer sur les antigènes qui pourront être déjà bloqués par

les anticorps marqués.

Le résultat de cette compétition dépendra donc de la concentration relative de chaque groupe d'anticorps. Mais, si la concentration en anticorps conjugué /sérum est trop importante, l'inhibition sera très faible en cas de sérum + .Par contre, si cette concentration est trop faible, la fluorescence sera faible en cas de négativité du sérum.

Par ailleurs, l'élément subjectif entre pour une part importante dans la lecture puisqu'il s'agit d'évaluer une diminution de la fluorescence par rapport à une fluorescence initiale donnée. Donc, sauf si l'inhibition est très importante, (sérum fortement +) la lecture de la réaction est sujette à de nombreuses erreurs.

Un autre inconvénient de cette méthode est l'obligation de titrer le sérum marqué pour chaque série d'expériences, ce qui allonge notablement la durée de réalisation de ce test et retire de son intérêt à l'immunofluorescence.

Tous ces éléments font que cette réaction n'est plus utilisée que dans la recherche étiologique de la toxoplasmosis.

-III-

EVOLUTION DE LA COURBE D'ANTICORPS DETECTES PAR
L'IMMUNOFLUORESCENCE

La courbe d'anticorps révélée par l'immunofluorescence chez l'homme ou expérimentalement chez l'animal, est superposable à celle du test de lyse.

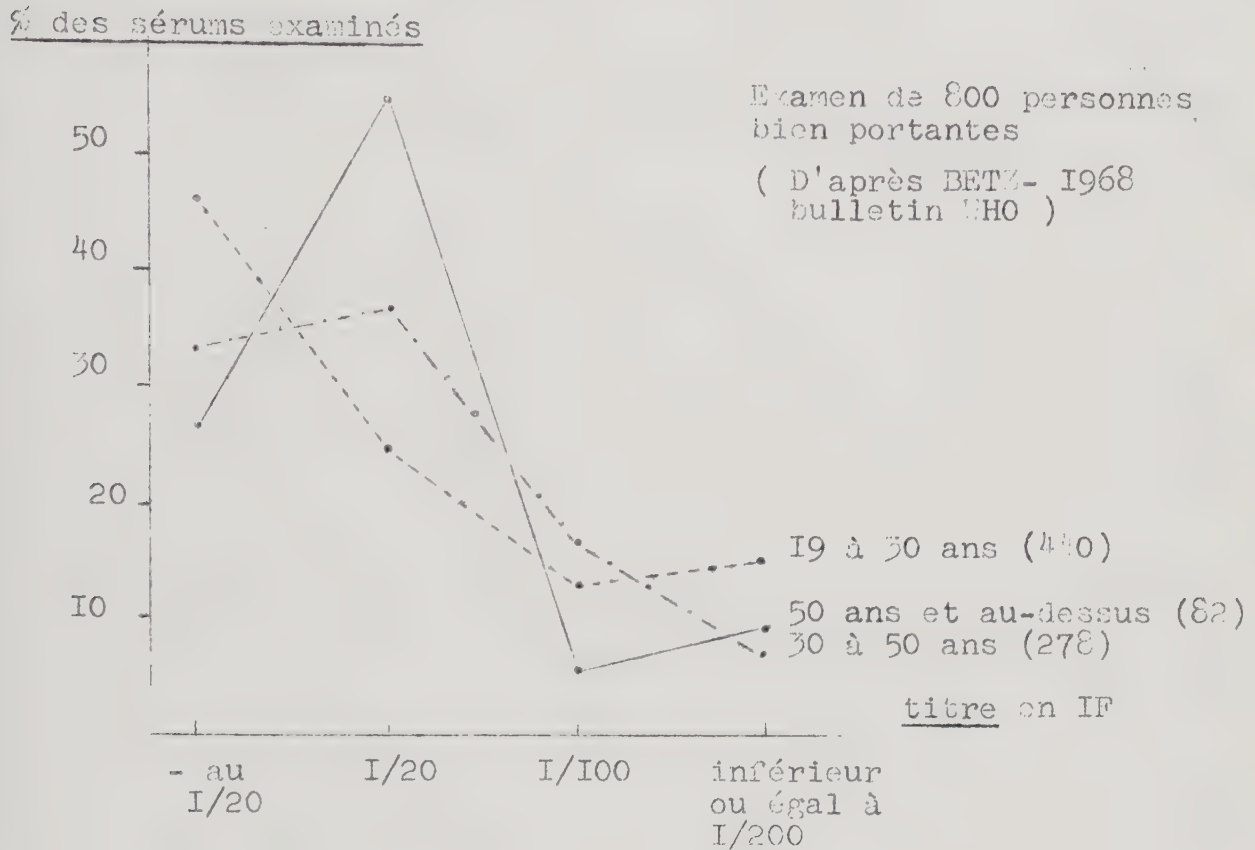
Chez l'homme, les anticorps apparaissent une semaine à 10 jours après le début de l'infection, augmentent jusqu'à un titre qui est en général supérieur à 1/2000 et persistent en plateau à ce niveau pendant plusieurs semaines ou mois. Puis le titre diminue lentement pour se stabiliser à un titre moyen ou bas (1/20 - 1/50) mais ne redevient jamais négatif.

Nous voyons donc déjà, que seule une élévation du titre des anticorps permet de poser le diagnostic de toxoplasmose aiguë.

Cependant, si le malade est vu pour la première fois à la phase de plateau de son titre d'anticorps, la sérologie ne permet pas de conclure.

De même, un malade présentant des signes cliniques de toxoplasmose oculaire peut très bien avoir un titre d'anticorps bas correspondant à la phase chronique de la maladie.

Si nous étudions maintenant le pourcentage de sujets présentant un titre d'anticorps donné, en fonction de l'âge:



Nous voyons qu'entre 19 et 30 ans, 45% des sujets examinés ne sont pas encore immunisés contre le toxoplasme, donc n'ont jamais fait de toxoplasmose. Ce pourcentage diminue avec l'âge.

Si nous examinons maintenant le pourcentage de sujets ayant un titre d'anticorps supérieur à I/200, nous voyons que il diminue aussi avec l'âge: la toxoplasmose est une maladie de l'adolescent.

ETUDE DE LA SENSIBILITE DE L'IMMUNOFLUORESCENCE

par comparaison des résultats obtenus par les différentes méthodes d'immunofluorescence avec ceux obtenus par les autres techniques employées pour le diagnostic sérologique de la toxoplasmosis .

Dans ce chapitre, nous allons analyser les résultats trouvés par différents auteurs.

Nous n'aborderons d'abord que de la méthode indirecte d'immunofluorescence qui est la plus habituellement utilisée, comparant les résultats avec ceux du test de lyse, test de référence.

Puis nous compareront quelques résultats de sérums étudiés parallèlement en immunofluorescence et fixation du complément, méthode très spécifique mais de sensibilité discutable.

Enfin, dans un dernier paragraphe, nous étudierons les résultats donnés par GOLDMAN dans une étude comparative du test de lyse et de la méthode d'inhibition de la fluorescence.

I° Comparaison des résultats obtenus sur des sérums étudiés parallèlement en DT et en IF (méthode indirecte)

a) Etude quantitative

Noms	nombre de sérums étudiés	nombre de sérums + en DT et IF	nombre de sérums - en DT et IF	% concordance	% discordance
AMBROISE THOMAS 1963	189	49	123	91%	9%
AMBROISE THOMAS 1968	1016	514	468	96,6%	3,4%
CAMARGO 1964	140	109	31	100%	
CAMARGO 1966	1000	768	225	99,3%	0,7%
BOISSEAU 1967	65	61	4	100%	
KELEN 1963	617	145	42	92,1%	7,9%
CAPPONI 1966	65	40	0	77%	23%
WALTON BENCHOFF 1966	1000	475	500	97,5%	2,5%
VAN NUNEN 1965	341	160	137	87%	13%

D'après ce tableau, nous voyons que les résultats qualitatifs trouvés, d'une part, en IF, d'autre en TLT concordent dans une proportion qui varie suivant les auteurs de 77% à 100% avec une moyenne de 92%.

Les discordances les plus nombreuses ont été trouvées par CAPPONI dans une étude portant sur 65 sérums. Or, si nous analysons ces résultats, nous voyons que ces divergences sont minimales, la plupart du temps sérum + ou - dans un test et douteux dans l'autre. Au maximum, les taux varient d'une dilution d'un test par rapport à l'autre.

Nous pouvons donc conclure, que les résultats fournis par l'immunofluorescence sont superposables à ceux du test de l'ase.

Etude des sérums discordants

Noms	nombre de sérums	nb. de sérums + en DT - en IF	nb. de sérums + en IF - en DT
AMBROISE THOMAS			
I963	12	6	6
AMBROISE THOMAS			
I968	34	12	22
CAMARGO			
I966	7	0	7
KELEN			
I963	49	45	4
CAPPONI			
I966	15	3	12
VAN NUNEN			
I965	44	10	34

D'après ce tableau, nous remarquons que l'immunofluorescence donne un peu plus de résultats positifs que le DT.

En particulier, l'analyse stricte des titres trouvés révèle que certains sérums + jusqu'à 1/128 en IF sont retrouvés négatifs en test de lyse (VAN NUNEN).

Cependant, en dehors de ces cas, peu nombreux, les discordances quantitatives sont faibles: un sérum trouvé - ou + par un test est douteux dans l'autre. Parfois, un sérum négatif dans un test est positif dans l'autre à la plus faible dilution et négatif aux dilutions supérieures.

Le plus grand nombre de discordances a été trouvée par KELEN ; or, il utilise une technique d'immunofluorescence pratiquement abandonnée actuellement. (l'antigène provient d'une coupe de tissus cérébral .)

Pour certains auteurs, l'immunofluorescence présente une sensibilité un peu supérieure à celle du test de lyse, mais cette opinion ne fait pas l'unanimité.

b) Etude qualitative

Noms	nombre de sérums étudiés	nombre de sérums +	titre idem en IF et DT en % du nb.	titre idem en à 1 dil. près de sérums +	IF DT
AMBROISE THOMAS 1963	189	49	71,4%	97,9%	
AMBROISE THOMAS 1968	1016	514	62,8%	98,2%	
CAMARGO 1964	140	109	43,1%	90,8%	
CAMARGO 1966	1000	768	52,9%	97,6%	
BOISSEAU 1967	65	61	42,6%	70,5%	
KELEN 1963	617	145	21,3%		
CAPPONI 1966	65	40	78%		
VAN NUNEN	341	160	36,2%	79,3%	
WALTON BENCHOFF 1966	1000	500	24,6%	69,7%	
FULTON 1964	20		28,6%	78,7%	

Les titres trouvés pour les mêmes sérums en IF et DT concordent, à une dilution près, dans 70 à 98% des cas selon les auteurs.

Il est difficile de tirer des conclusions strictes de ces tableaux, car nous comparons deux méthodes dont nous avons vu que la reproductibilité interne même n'était pas parfaite.

Pour l'immunofluorescence, tous les auteurs n'utilisent pas les mêmes antigènes, les mêmes conjugués etc...

De plus, les sérums ne sont pas toujours testés aux mêmes dilutions en test de lyse et en immunofluorescence.

Cependant, il semble bien que les résultats trouvés en IF concordent qualitativement et quantitativement avec ceux du test de lyse.

Nous pouvons donc en conclure que l'immunofluorescence présente une sensibilité semblable à celle du test de lyse, test de référence.

2° Comparaison des résultats trouvés sur des sérums étudiés en IF et réaction de fixation du complément

La concordance qualitative aussi bien que quantitative de ces deux tests est beaucoup moins bonne:

Dans une étude portant sur 14 sérums, FULTON trouve une concordance qualitative de 64,3% et quantitative de 44,4% dans les limites d'une dilution de raison 2. Dans presque tous les cas, le titre est supérieur en IF.

VAN HUNEN sur 102 sérums étudiés trouve 92 sérums - en CF et + en IF : des taux variant entre 1/32 et 1/2048.

Nous pouvons donc penser, malgré le petit nombre de sérums étudiés, que la réaction de fixation du complément est beaucoup moins sensible que l'immunofluorescence.

Cependant, ne l'oublions pas, là encore nous comparons deux méthodes tout à fait différentes qui, de plus, mettent en jeu des anticorps différents.

D'autre part, les anticorps fixant le complément apparaissent tard, n'atteignent jamais des taux élevés et disparaissent rapidement.

Il est donc possible que les divergences observées entre les résultats de la réaction de fixation du complément et l'IF portent sur des sérums de sujets ayant dépassé la phase aiguë de la maladie et, chez lesquels, par conséquent, les anticorps fixant le complément ont déjà disparus alors même que les anticorps réactifs en IF sont encore présents dans le sérum à un taux élevé.

2° Comparaison des résultats obtenus sur les sérums
étudiés parallèlement en DT et réaction d'inhibition de la
fluorescence

Cette étude faite par GOLDMAN sur 183 sérums montre qu'il existe une concordance qualitative dans 85% des cas. D'autre part 83% des sérums présentent le même titre en IF et DT à 2 dilutions de raison 4 près. Par contre, 30% des sérums présentent un titre différent de plus de 2 dilutions en IF et DT, et, dans ce cas, on trouve un titre inférieur en inhibition.

On voit donc, que la sensibilité de l'inhibition de la fluorescence est moins bonne que celle du test de lyse, et ceci, d'autant plus que les pourcentages sus-cités sont surestimés: GOLDMAN utilise en effet des dilutions de raison 2 pour l'immunofluorescence alors qu'en test de lyse, les dilutions sont de raison 4.

Cette discordance entre les résultats du test de lyse et de l'inhibition de la fluorescence peut être due, là plus qu'ailleurs, à des causes techniques mais aussi à la grande sensibilité du DT qui permet de mettre en évidence, à des taux très bas, des anticorps non spécifiques qui ne réagissent pas en immunofluorescence.

L'IMMUNOFLUORESCENCE PAR CONJUGUE ANTI-IgM

La découverte d'anticorps chez un sujet suspect de toxoplasmose ne confirme pas absolument le diagnostic.

En effet, aussi bien dans la forme congénitale que dans la forme acquise, les signes cliniques de la maladie, si évocateurs soient-ils, ne sont pas spécifiques. D'autre part, nous avons vu que, dans la forme acquise, le taux d'anticorps peut rester longtemps élevé. Le seul moyen d'affirmer le diagnostic dans ce cas, serait de mettre en évidence une montée du taux des anticorps; mais le sujet peut être examiné à un moment où son taux d'anticorps est déjà maximum.

Dans la toxoplasmose congénitale, le diagnostic sérologique est troublé par la présence possible d'anticorps maternels transmis.

La recherche des parasites pose aussi des problèmes:

On peut retrouver pendant très longtemps des kystes toxoplasmiques dans les tissus extra-neuraux. Seule la découverte de formes végétatives sur les coupes histologiques permettrait d'affirmer l'origine toxoplasmique d'un syndrome observé; ceci est évidemment très difficile.

Par ailleurs, l'isolement de toxoplasmes par inoculation de produits suspects à l'animal peut ne pas être suffisamment rapide lorsqu'on a affaire à des souches peu virulentes pour l'animal. Or, il est important d'avoir un diagnostic rapide lorsqu'il s'agit, par exemple, de traiter un nouveau-né suspect de toxoplasmose congénitale et ne présentant pas encore de lésions cliniques.

On s'est donc attaché à rechercher d'autres méthodes de diagnostic sérologique chez un sujet suspect présentant une sérologie + pour le toxoplasme.

On savait que des anticorps de type I9 S étaient formés précocement dans certaines maladies infectieuses de l'adulte et de l'enfant.

REMINGTON dans ses travaux, à partir de 1966, a essayé de déterminer si des anticorps de type I9 S étaient produits pendant la phase aiguë de la toxoplasmose, et si la mise en évidence de ceux-ci permettait d'établir le diagnostic de toxoplasmose aiguë congénitale ou acquise.

L'objet de son premier travail (1966) a été la caractérisation des anticorps formés:

a) Matériel et méthode

=sérums de sujets suspects de toxoplasmose congénitale
=sérums de sujets suspects ou confirmés de toxoplasmose acquise.

sur tous ces sérums on fait:

= DT selon la technique de FRENKEL et LUNDE

= hémagglutination selon la technique de LUNDE et JACOBS

= chromatographie sur colonne de séphadex par laquelle on obtient 3 pics qui seront ensuite étudiés en ultracentrifugation analytique

= dans le premier pic on trouve des globulines de type I9S

= dans le deuxième des globulines de type 7S

Ces deux types de globulines seuls nous intéressent ici

= ultracentrifugation en gradient de sucrose

On obtient plusieurs fractions:

- =dans les fractions I à 6, des anticorps de type I9S
- =dans les fractions 8 à I9, des anticorps de type 7S

Les constituants de ces différentes fractions étudiées en double diffusion sur gélose avec des antisérums IgG et IgM montrent que:

- =dans les fractions 4 à 6 anticorps supportés par des IgM
- =dans les fractions 8 à I9 anticorps supportés par des IgG

b) Résultats

Chez des nouveaux-nés de mère présentant une toxoplasmose chronique, on ne retrouve des anticorps dans le sang du cordon ou le sang veineux prélevé à la naissance, que dans la fraction 7S des immunoglobulines.

De même, dans le sérum de sujets présentant une toxoplasmose chronique, on trouve des anticorps de type 7S (IgG)

Dans IO cas sur II de sujets suspects de toxoplasmose aiguë acquise (diagnostic confirmé par la sérologie, l'isolement du parasite ou les antécédents d'accident de laboratoire) on trouve dans le sérum des globulines I9S (IgM)

Dans I de ces cas, victime d'un accident de laboratoire, à une phase d'exacerbation clinique et sérologique de la maladie, correspond une réapparition d'anticorps I9S qui avaient disparus.

Une femme ayant donné naissance deux ans auparavant à un enfant toxoplasmique présentait, avant la grossesse et pendant le I^{er} trimestre, un DT stable à I/64 avec des anticorps 7S seuls. Au 9^e mois de grossesse le DT est I/I024 et

on note la présence d'anticorps 7S et I9S dans le sérum.

L'enfant est normal et son sérum ne contient que des anticorps de type 7S. Pour la mère il s'agit soit d'une réinfection, soit d'une réactivation des parasites présents dans les tissus.

Les résultats précédents montrent que des anticorps lysant et hémagglutinant de type 7S et I9S sont produits en réponse à une infection toxoplasmique aiguë acquise et confirment la découverte d'EICHENWALD et SHINEFIELD que des anticorps I9S peuvent être produits par le fœtus, in utéro, en réponse à une infection maternelle.

Par contre, les anticorps de type 7S retrouvés chez les enfants nés de mère présentant une toxoplasmose chronique peuvent être mis sur le compte d'un passage transplacentaire de ce type d'anticorps.

Les anticorps I9S formés in utéro, lors d'une toxoplasmose congénitale, semblent bien formés par l'enfant car on ne les retrouve pas nécessairement dans le sérum de la mère (si celle-ci n'est plus dans la phase aiguë de la maladie.)

Cependant, la séparation des anticorps I9S (IgM) et 7S (IgG) par les méthodes classiques, est un travail laborieux. Pour cela, REMINGTON a mis au point une technique simple, facilement réalisable au laboratoire, permettant de mettre en évidence les anticorps toxoplasmiques IgM lors d'une infection aiguë: L'immunofluorescence par conjugué anti-IgM

a) Matériel et technique

Deux grands groupes de sérums:

- I) l'un pour l'étude de la toxoplasmose congénitale
 - = sérum de nouveau-nés atteints.
 - = sang du cordon.

On effectue divers contrôle de ces antisérums:

- a) = sérum anti-IgM + sérum contenant des IgG seules = pas d'arc de précipitation en diffusion sur gélose, et inversement avec les IgG
= sérum anti-IgM + sérum humain normal
I arc de précipitation (l'arc normal formé par le complexe IgM-anti-IgM)

b) traitement de ces sérums par le 2ME

34 sérums contenant des anticorps IgM toxoplasmiques (DT I/1024 à I/5000) sont mis à l'incubation à 37° 1 heure, en présence de 2 mercapto-ethanol 0,02 molaire dilué dans du sel de phosphate tampon (pH 7,2).

Ces sérums sont ensuite étudiés en iF par conjugué anti-IgM= pas de fluorescence en microscopie ultra violette.

Par contre, si l'on fait l'expérience avec un sérum contenant des anticorps IgG, on voit que le 2ME ne détruit pas leur activité et donc, on observe une fluorescence nette.

Si un sérum est pour le toxoplasme en DT, hémagglutination et immunofluorescence, il ne devient jamais + après le traitement par le 2ME.

b) Résultats

Les anticorps de type IgM peuvent être mis en évidence par les 4 méthodes employées qui sont cependant de sensibilité très différente.

Le traitement par le 2ME ne semble pas modifier le DT chez des sujets chez lesquels on décèle cependant des anticorps toxoplasmiques dans les globulines IgM.

Par contre, on note une diminution du titre en hémagglutination après un tel traitement, mais ceci de façon très irrégulière.

b) l'autre pour l'étude de la toxoplasmose acquise

- = sujets suspects
- = sujets présentant des signes cliniques de toxoplasmose
- = sujets pris au hasard
- = sujets hospitalisés pour des raisons diverses
- = sujets chez lesquels on trouve une augmentation des IgM (mononucléose infectieuse, waldenstrom) avec sérologie + en toxoplasmose.

Les sérums sont conservés à -20°C. On ne note pas après une telle conservation, de modification du titre des IgM ni des IgG.

On fait sur chacun des sérums:

= DT

= Hémagglutination: ces deux tests sont faits avant et après action du 2 mercapto-ethanol, qui détruit l'activité anticorps des IgM

= ultra centrifugation en gradient de sucrose puis DT directement sur les différentes fractions.

= Immunofluorescence par conjugué anti-IgM

L'IF PAR CONJUGUE ANTI-IgM

1° l'antigène: il provient comme toujours d'une ascite de souris infectée par le parasite

2° le conjugué: sérum de chèvre anti-IgM humaines, utilisé à la dilution 1/100 et conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine

sérum anti-IgM humain conjugué, négatif en DT

La principale difficulté dans l'interprétation des résultats du DT et de l'hémagglutination après traitement réside dans la présence d'anticorps IgM à titre élevé dans ces sérums, ce qui masque les effets du 2ME sur les IgM.

Ceci semble confirmé par le fait que, dans la toxoplasmosé congénitale, une diminution du titre en hémagglutination n'est pas notée dans les sérums initiaux obtenus chez les enfants, mais plus souvent sur des sérums ultérieurs quand les anticorps maternels transmis IgG disparaissent progressivement.

Par contre, la présence d'anticorps IgG ne modifie pas les résultats obtenus par la centrifugation en gradient de sucrose ni l'IF.

La centrifugation en gradient de sucrose étant longue et difficile à réaliser, c'est donc l'immunofluorescence par conjugué anti-IgM qui se révèle la plus utile dans la mise en évidence d'anticorps IgM toxoplasmiques.

Nous allons maintenant étudier les résultats obtenus par l'ultracentrifugation en gradient de sucrose et l'immunofluorescence dans les formes particulières acquises et congénitales de la maladie.

I° Forme congénitale

L'étude porte sur 18 sérums de mères et d'enfants. Des anticorps ont été mis en évidence dans les fractions du gradient de sucrose contenant les IgM chez 10 sur 12 des enfants étudiés dans l'échantillon initial, et chez toutes les mères sauf une lorsque l'examen a été fait à la même date.

Pour les deux enfants chez lesquels ce test était négatif, il y avait un test + chez l'une des mères, il n'avait pas été fait chez l'autre; toutes deux avaient un titre d'anticorps à 1/6 en immunofluorescence.

L'immunofluorescence par conjugué IgM était positive

dans tous les cas, et le sérum obtenu le même jour, dans les 8 jours suivants la naissance, montrait un titre semblable, à une dilution près, chez la mère et l'enfant, sauf dans un cas (256 chez l'enfant, 8 chez la mère).

Les immunoglobulines ne traversant pas la barrière placentaire saine, la présence de telles globulines chez l'enfant sont autant de facteurs qui montrent bien que ceux-ci sont formés par l'enfant, in utéro, en réponse à un stimulus antigénique, dans ce cas le toxoplasme.

Actuellement, on ne peut cependant pas savoir si de tels anticorps IgM apparaissent dans tous les cas de toxoplasmose congénitale, bien que jusqu'à présent, on n'ait encore jamais trouvé de sujets atteints de toxoplasmose congénitale avec un sérum - en IF par conjugué anti-IgM.

2° Forme acquise

Dans 17 cas sur 18 (tous négatifs en DT et hémagglutination) de toxoplasmose aiguë acquise étudiés, le gradient de sucrose est + pour les IgM mais devient - sur les échantillons obtenus ultérieurement (3 à 9 mois). Dans le sérum négatif en gradient de sucrose, l'IF par conjugué IgM montrait la présence d'anticorps IgM à un taux de 1/32. Secondairement, on retrouve des IgM dans le gradient de sucrose, alors même que le titre de ces anticorps diminue en IF.

Tous ces sérums sont positifs en IF et le restent pendant toute la durée de l'étude (1 à 2 ans), sauf chez deux sujets: l'un, traité par les immunosuppresseurs, devient négatif au bout de 3 mois, l'autre devient spontanément négatif au bout de 36 mois.

Au total, quand des anticorps sont mis en évidence

par le DT, hémagglutination, ultracentrifugation en gradient de sucrose, ils le sont aussi par l'immunofluorescence.

Par contre, l'immunofluorescence permet de mettre en évidence des anticorps IgM que ne décèlent pas les autres tests.

Dans une population prise au hasard, ayant un DT +, de titre 4 à 4096, l'immunofluorescence ne montre pas d'anticorps IgM, sauf chez un sujet ayant un DT à 4096 et présentant une adénopathie d'origine inconnue.

Par contre, l'étude de sérums de plusieurs familles d'une même ville, prises au hasard, décèle une positivation de l'immunofluorescence coïncidant à celle de l'hémagglutination, qui persiste jusqu'à 8 ans dans un cas.

REMYINGTON a ensuite étudié l'influence d'une augmentation des IgM sur la sérologie toxoplasmique:

Sur 31 cas de mononucléose infectieuse, 9 ont une sérologie + en DT, mais l'immunofluorescence ne permet pas de mettre en évidence des anticorps toxoplasmiques IgM chez eux.

Dans 3 cas de Waldenström ayant une sérologie toxoplasmique +, l'immunofluorescence par conjugué anti-IgM est négative pour la toxoplasmose.

Au total:

Sur 299 sérums étudiés au hasard avec DT +, 5,7% étaient + en immunofluorescence anti-IgM, pour un cas seulement, le diagnostic de toxoplasmose aiguë était plausible.

Par contre, un niveau élevé d'IgM, comme on peut le voir dans la mononucléose infectieuse ou la macroglobulinémie de Waldenström, ne modifie pas les résultats de l'immunofluorescence par conjugué anti-IgM. On n'observe pas de fausses positivités.

Il ressort de cette étude que la présence d'anticorps toxoplasmiques dans la fraction IgM d'un nouveau-né ou d'un nourrisson permet d'affirmer d'origine toxoplasmique de lésions congénitales suspectes. Ces anticorps ne passant pas la barrière placentaire, sont formés in utéro par le fœtus en réponse à une agression par le toxoplasme.

Par contre, chez un sujet suspect de toxoplasmose acquise, la positivité de l'immuno-fluorescence par conjugué anti-IgM ne permet pas d'affirmer l'origine toxoplasmique des lésions observées, en raison de la persistance prolongée d'anticorps IgM dans le sérum (plusieurs mois voire plusieurs années).

CONCLUSIONS

-I-

Parmi les méthodes employées à ce jour dans le diagnostic sérologique de la toxoplasmose, aucune n'est dénuée d'inconvénients.

1° le test de CABIN et FELDMAN (Dye-test)
le plus souvent pratiqué en France sous sa forme modifiée par DESMONTS (test de lyse), reste le test de référence. Cependant, d'une part cette réaction exige l'utilisation de souches de toxoplasmes vivants entretenues par passage péritonéal sur la souris. D'autre part, elle met en jeu plusieurs facteurs sériques, en particulier le "facteur accessoire", difficile à obtenir et à conserver.

Enfin, la lecture du test, longue et délicate, relève de laboratoires spécialisés et le rend inutilisable dans les enquêtes épidémiologiques.

2° la réaction de fixation du complément
très spécifique mais beaucoup moins sensible que le dye-test, est cependant fréquemment utilisée, spécialement pour établir le diagnostic d'une toxoplasmose en évolution. En effet, les anticorps, bien que d'apparition tardive, disparaissent rapidement après la phase aiguë de la maladie. Ainsi donc, une positivité de la réaction permettrait de rattacher des signes observés à la toxoplasmose.

3° l'immunofluorescence indirecte, comparativement aux deux méthodes précédentes, offre des avantages certains: utilisation de toxoplasmes tués, stockage facile du matériel antigénique en étalement sur lames et surtout, non intervention du "facteur accessoire" dans la réaction.

Sa réalisation simple et sa lecture rapide la rendent applicable aux enquêtes épidémiologiques, particulièrement dans la surveillance des femmes enceintes, et chaque fois qu'un diagnostic doit être rapide et sûr comme dans la toxoplasmose congénitale.

Ses principaux inconvénients résident dans la qualité variable de l'anticène et du conjugué et dans la nécessité d'un appareillage optique coûteux.

-II-

Dans ce travail nous avons donné un aperçu des trois techniques d'immunofluorescence utilisables en pratique:

1° méthode directe qui permet, à l'aide d'un conjugué fluorescent de détecter la présence de toxoplasmes dans un produit pathologique.

Bien que l'immunofluorescence apporte une amélioration par rapport aux méthodes anciennes de mise en évidence des parasites dans les tissus, cette dernière est délicate et souvent aléatoire.

2° méthode indirecte qui met en évidence la présence d'anticorps toxoplasmiques dans un sérum en révélant le complexe antigène-anticorps par un conjugué anti-globulines humaines.

C'est la seule technique d'immunofluorescence actuellement utilisée dans le diagnostic de la toxoplasmose.

3° méthode d'inhibition de l'immunofluorescence par action d'un sérum anti-toxoplasmique conjugué.

Cette technique, très peu reproductible et beaucoup moins sensible que le test de lyse, est actuellement abandonnée.

-III-

Nous avons ensuite analysé la qualité des résultats obtenus par l'immunofluorescence indirecte dans le diagnostic sérologique de la toxoplasmose.

1° la spécificité de la réaction s'est révélée suffisamment stricte.

2° la reproductibilité est bonne à l'intérieur d'un même laboratoire, mais varie d'un laboratoire à l'autre.

La variabilité des résultats tient à la qualité de l'antigène utilisé (et sur ce point, l'antigène préparé à partir de cultures cellulaires, d'utilisation récente, pourrait apporter une amélioration notable), au conjugué, de valeur très variable selon son origine, à l'appareillage optique et à la réalisation même de la réaction qui n'est pas strictement codifiée.

Ce problème pourrait être résolu à l'avenir par l'expression des positivités sous forme d'unités internationales.

3° nous avons ensuite étudié les résultats obtenus sur des sérums testés parallèlement en immunofluorescence indirecte et en test de lyse et avons constaté une sensibilité comparable des deux méthodes. On retrouve, en effet, une concordance des titres, à une dilution près, dans 70 à 98% des sérums.

-IV-

Enfin, nous avons analysé une technique nouvelle d'immunofluorescence mise au point par REMINGTON aux ETATS-UNIS:

L'immunofluorescence par conjugué anti-IgM. Cette méthode cherche à affirmer le diagnostic de toxoplasmose aigue.

En fait, si la présence d'anticorps dans la fraction IgM pourrait permettre, chez un nouveau-né, d'affirmer le diagnostic de toxoplasmose congénitale, l'application de cette méthode à la forme acquise, en revanche, n'a pas donné les résultats escomptés.

De plus, là encore, la qualité du conjugué joue un rôle capital.

Cette méthode est actuellement à l'état d'étude.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	p. 9
I. PRINCIPE DE LA METHODE	p. 13
-Méthode directe	p. 14
-Méthode indirecte	p. 15
-Méthode d'inhibition	p. 16
II. TECHNIQUE ET RESULTATS	
<u>-Méthode directe</u>	p. 17
= Résultats	
a) spécificité	p. 18
b) capacité de coloration des toxoplasmes après différents traitements	p. 19
<u>-Méthode indirecte</u>	p. 20
= Résultats	
a) spécificité	p. 23
b) reproductibilité	p. 24
<u>-Méthode d'inhibition</u>	p. 26
= Résultats	
a) reproductibilité	p. 27
b) spécificité	p. 28
c) explication du phénomène	p. 28
III. EVOLUTION DE LA COURBE D'ANTICORPS DETECTES PAR L'IF	p. 30
IV. ETUDE DE LA SENSIBILITE DE L'IMMUNOFLUORESCENCE	p. 32
1° Comparaison des résultats du DT et de l'IF	
a) étude qualitative	p. 33
b) étude quantitative	p. 37
2° Comparaison des résultats de l'IF et de la réaction de fixation du complément	p. 39
3° Comparaison des résultats de la méthode d'inhibition et du DT	p. 40
V. L'IMMUNOFLUORESCENCE PAR CONJUGUE ANTI-IgM	p. 41
= Résultats	p. 47
VI. CONCLUSIONS	p. 51

BIBLIOGRAPHIE

o o o o o

1. AMBROISE-THOMAS (P.).--L'immunofluorescence dans le diagnostic direct et indirect des parasitoses: Application à la toxoplasmose. Thèse médecine Lyon, 1963
2. AMBROISE-THOMAS (P.). GARIN (J.P.).--Amélioration de la technique d'immunofluorescence par l'emploi de contre-colorants: application à la toxoplasmose. Presse médicale 74: 2215, 1966
3. BARON (A.). DESMONTS (G.).--L'examen de l'humeur aqueuse au cours des uvéites toxoplasmiques. Bull. soc. opht. fr. 8: 793, 1959
4. BARON (A.). DESMONTS (G.).--Remarques à propos de la toxoplasmose oculaire. Bull. soc. bel. opht., 130: 287; 1966
5. BETZ (A.).--Diagnostic sérologique de la toxoplasmose au cours d'antigènes préparés sur cultures cellulaires. Bull. WHO, 39: 367, 1968
6. BEUTNER (E.H.).--Immunofluorescent staining: the fluorescence antibody method. Bact. rev., 25: 49, 1961
7. BOISSEAU (M.). MOULINIER (C.).--Immunofluorescence sur les toxoplasmes. Comparaison avec la technique de l'immunofluorescence. Bull. soc. bel. opht., 60: 405, 1967
8. CAMARGO (M.E.).--Improved technic of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. Rev. inst. med. hosp. Sao Paulo, 6 n°3: 117, 1964

9. CAMARGO (M.E.).-Comparative evaluation of toxoplasmosis in-direct fluorescent and Sabin-Feldman Dye-test in a thousand sera; a few unexpected results; Rev..inst. med.. trop. Sao Paulo, 8: 62, 1966
10. CAPPONI (M.).-Constations personnelles sur le diagnostic sérologique de la toxoplasmose par l'immunofluorescence. Bull. soc. path. exot., 59 n°1: 77, 1966
11. CARVER (R.) GOLDMAN (M.).-Staining toxoplasma gondii with fluorescein-labelled antibody -III- the reaction in frozen and paraffin sections. Am. J. cl..path., 32: 159, 1959
12. COHEN (I.) NORINS(R.).-Competition between IgM and IgG antibody and effectiveness in indirect fluorescent antibody and other tests. J. imm., 98: 143, 1967
13. COONS (A.H.).-The diagnostic application of fluorescent antibodies. Schweiz z. path. bakt., 22: 700, 1959
14. COONS (A.H.).-Antibodies and antigens labelled with fluorescein. Schweiz Z.path. bakt., 22: 693, 1959
15. COUVREUR (J.).-Etude sur le toxoplasmose congénitale. Thèse Paris, n°745, 1955
16. COUVREUR (J.).-Aspects de la toxoplasmose congénitale. Rev.hyg. med. soc., 10: 187, 1962
17. DESMONTS (G.).-Diagnostic sérologique de la toxoplasmose. Sem. hop. Paris, (path. biol.), 8: 109, 1960
18. DESMONTS (G.).-Sérodiagnostic de la toxoplasmose. Ann. biol. clin., 19: 13, 1961
19. DESMONTS (G.).-Diagnostic biologique de la toxoplasmose Bull.inf. Minist. aff. soc., n°1: 29, 1966
20. DESMONTS (G.).-Diagnostic définitif de la toxoplasmose oculaire. Arch. opht. 76:n°6, 839, 1966

21. DESMONTS (G.) BARON (A.) OFFRET (G.).-La production locale d'anticorps au cours des toxoplasmoses oculaires.
Arch. opht., 2: 137, 1960
22. DESMONTS (G.) COUVREUR (J.).-Enquête sur la toxoplasmose congénitale. Bull. inst. nat. hyg., 18: 209, 1963
23. DESMONTS (G.) COUVREUR (J.).-Toxoplasmose: mère et enfant.
Arch. Fr. ped., 22 n° 10: 1183, 1965
24. DULONG de ROSNAY (C.) BOINEAU (J.).-Une méthode d'investigation immunologique d'intérêt général: l'immunofluorescence. Jour. méd. Bordeaux, 10: 1453, 1962
25. ELIAS (M.I.).-Methodes diagnostiques et immunité dans la toxoplasmose. Ann. paras. hum., comp., 42: 283, 1967
26. ENGELBRECHT (E.).-A new test for diagnosis of toxoplasmosis the slide agglutination test. Path. et microbio. 28 n° 4: 907, 1963
27. FLECHTER (S.).-Indirect fluorescent antibodies technic in the diagnosis of toxoplasma gondii. J. clin. pat. 18 n° 2: 193, 1965
28. FLECK (D.G.).-Serological tests for toxoplasmosis.
Nature 189: 1018, 1961
29. FOSTER (B.G.).-Studies of active and passive immunity in animals inoculated with toxoplasma. Can. J. microbio. 14 n° 2: 103, 1968
30. FRIBOURG-BLANC (A.) NIEL (G.).-Le diagnostic sérologique de la syphilis par la technique de l'immunofluorescence.
Presse med. 70: 1875, 1962
31. FRIBOURG-BLANC (A.) NIEL (G.).-Application de l'immunofluorescence au diagnostic sérologique de la syphilis.
Bull. soc. derm. syph., 67: 946, 1960

32. FULTON (J.D.) TURK (J.L.).-Direct agglutination test for toxoplasmosis. *Lancet*, II: 1068
33. FULTON (J.D.) VOLLER (A.).-Evaluation of immunofluorescent and direct agglutination methods for detection of specific toxoplasma antibodies. *British med. J.*, 2: 1173 1964
34. GARIN (J.P.) AMBROISE-THOMAS (P.).-Diagnostic sérologique de la toxoplasmose par la méthode des anticorps fluorescents. *Presse med.*, 71 n°52: 2485, 1963
35. GARIN (J.P.) AMBROISE-THOMAS (P.).-Utilisation d'un antigène figuré lyophilisé pour le diagnostic sérologique de la toxoplasmose par l'immunofluorescence. *Lyon med.*, 218 n°52: 1673, 1967
36. GARIN (J.P.) AMBROISE-THOMAS (P.).-Intérêt de la fluorescence et de l'immunofluorescence dans le diagnostic sérologique et parasitologique de la toxoplasmose. *Rev. inst. Pasteur Lyon*, I n°2: 179, 1968
37. GIRAUD (P.) LAUGIER (M.).-Reflexion à partir de quelques cas de toxoplasmose. *Marseille med.*, 98: 207, 1961
38. GIRAUD (P.) PAYAN (H.).-Toxoplasmose congénitale aiguë du cobaye expérimentale. *Ann. anat. path.* 10 n°4: 337, 1965
39. GOLDMAN (M.).-A new serologic test for toxoplasma antibody using fluorescein labelled globulin. *Am. J. trop med. hyg.* 5: 375, 1956
40. GOLDMAN (M.).-Staining toxoplasma gondii with fluorescein-labelled antibodies. -II- A new serologic test for antibodies to toxoplasma based upon inhibition of specific staining. *J. exp. med.* 105: 557, 1957
41. GOLDMAN (M.).-Staining toxoplasma gondii with fluorescein-tagged antibodies -I- reaction in smears of peritoneal exsudate. *J. exp. med.* 105: 549, 1957

42. GOLDMAN (M.).-Comparision of titers of dye-test and fluorescent inhibition test in the serologic diagnosis of toxoplasmosis. Am. J. clin. pat., 37 n°5: 541, 1962
43. GOLDWASSER (R.A.) SHEPARD (C.C.).-Staining of complement and modification of fluorescent antibody procedures. J. immunol., 80: 122, 1957
44. JACOBS (L.) COOK (L.K.).-Variations in the dye-test for toxoplasmosis. Am. J. trop. med.,hyg., 3: 860, 1954
45. JACOBS (L.) LUNDE (M.N.).-Hemagglutination-test for toxoplasmosis. J. parasito., 43: 308, 1957
46. JONES (M.H.).-Taux d'anticorps et fin de grossesse. Am. J. obst. gyn., 95: 809, 1966
47. KELEN (A.E.) AYLLON.-Indirect fluorescent antibodies method in diagnosis of toxoplasmosis. Can. J. microbio., 8: 545, 1962
48. KRAMAR (J.) CERNA (Z.) CHALUPSLY (J.).-Immuno-fluorescence reactions in the serological diagnosis of toxoplasmosis. Trop. dis. bull., 62 n°2: 141, 1965
49. LAUGIER GIRAUD (P.) GIRAUD (H.).-Problèmes posés chez l'enfant par le diagnostic sérologique de la toxoplasmose. Arch. Fr. ped., 22 n°10: 1201, 1965
50. LELONG (M.).-Prophylaxie de la toxoplasmose du nouveau-né et de la femme enceinte. Rev. hyg. med. soc. 7: 71, 1959
51. LELONG (M.) DESMONTS (G.).-Sur la signification des réactions sérologiques de la toxoplasmose en clinique humaine. Presse med. 63: 133, 1955
52. MARSHALL (J.D.) EVELAND (W.C.) SMITH (C.W.).-Superiority of fluorescein isothiocyanate (RIGGS) for fluorescent antibody technic with a modification of its application. Proc. soc. exp. biol. med., 98: 898, 1959

53. NAIRN (N.C.).-Marquage des protéines par fluorescence et méthode des anticorps fluorescents. *Endeavour*, 20: 78, 1961
54. NIEL (G.).-A propos du test d'immunofluorescence quantitatif appliqué au diagnostic sérologique de la toxoplasmose: introduction des unités internationales dans l'expression des positivités. *J. parasito.*, 56 n°4, 1970
55. NIEL (G.) FRIBOURG-BLANC (A.).-Technique actuelle du test d'immunofluorescence appliqué au diagnostic de la syphilis. *Ann. inst. Past.*, 102: 616, 1962
56. NOWOSLANSKI (A.) BRZOSKO (P.) DYMOSKA (Z.).-The use of labelled antibodies in the studies on *Toxoplasma gondii*. *Pol. tyg. icz.*, 17: 745, 1962
57. OSBORN (J.) DANCIS (J.) JULIA (J.F.).-Studies of immunology of the newborn infant -II Interference with active immunization by passive transplacental circulating antibody. *Ped.* 10: 328, 1952
58. PIGUET (H.).-Toxoplasmose ganglionnaire acquise de l'adulte. *Bor. hop. Paris*, 42 n°20: 1251, 1966
59. REMINGTON (J.) KENNETH (L.).-Serum proteins and antibody activity in human nasal secretions. *J. clin. invest.* 43 n°1: 161, 1964
60. REMINGTON (J.) MILLER (M.J.).-Antitoxoplasma antibodies in diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasmosis. *Proc. soc. exp. biol. med.* 121: 357, 1966
61. REMINGTON (J.S.) MILLER (M.J.) BROWNLEE (I.).-IgM antibodies in acute toxoplasmosis -I Diagnostic significance in congenital cases and a method for their rapid demonstration. *Ped.* 41 n°6: 1082, 1968
62. REMINGTON (J.S.) MILLER (M.J.) BROWNLEE (I.).-IgM antibodies in acute toxoplasmosis -II Prevalence and significance in acquired cases. *J. lab. clin. med.*, 71 n°5: 855, 1968

63. RUIZ (A.) FLORES (M.) KOTCHER (E.).-The prevalence of toxoplasmosis antibodies in Costa Rican post-partum women and their childrens. *Ann. trop. med. parasito.*, 60: 429, 1966
64. RUSSEL (S.).-The fate of fluorescein labelled soluble antigen-antibody complex in the mouse. *J. inf. dis.*, 3: 55, 1962
65. SABIN (A.B.) FELDMAN (H.A.).-Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (toxoplasma).. *Science*, 108: 660, 1968
66. SCHWEIZER (E.).-Toxoplasmosis et grossesse. *Gynaec. (Genève)* 162 n°5: 424, 1966
67. SEVER (J.L.) ROBERTS (J.L.).-Toxoplasmosis: serological and clinical studies of 23000 pregnant women. *Comm. au cong. mond. de gyn. obst.*, Rio de Janeiro 1964
68. STADTSBEADER (S.) TELLIER.-Diagnostic sérologique de la toxoplasmosis par l'immunofluorescence. *Acta clin. Belg.* 19 n°3: 161, 1964
69. TOBIE (J.E.).-Certain technical aspects of fluorescence microscopy and the COONS fluorescent antibody technic. *J. histochem. cytochem.*, 6: 271, 1958
70. VAN NUNEN (M.C.) VAN DER VEEN (J.).-Examination for toxoplasmosis by the fluorescent antibody technic. *Trop. geo med.* 17 n°3: 246, 1965
71. WALTON (B.C.) BENCHOFF (B.M.).-Comparison of the indirect fluorescent antibodies test and methylen blue dye test for detection of antibodies to toxoplasma gondii *Am. J. trop. hyg.*, 15 n°2: 149, 1966
72. WITMER (R.).-Antibody formation in rabbit eye studied with fluorescein labelled antibodies. *AMA Arch. opht.*, 53: 811, 1955

